カラムバックフラッシュを用いた Agilent 7890A/5975C GC/MSDによる 乳製品中のメラミンおよびシアヌル酸の 高速スクリーニング

アプリケーション

食品安全性

著者

Min Cai, Chongtian Yu, Yun Zou,
and Wei Luan
Agilent Technologies (Shanghai) Co. Ltd.
412 Ying Lun Road
Waigaoqiao Free Trade Zone
Shanghai 200131
China

概要

Agilent 7890A/5975C GC/MSDとAgilent J&W HP-5ms GCカラムを使用し、乳製品中のメラミンおよびシアヌル酸を検出するための高速スクリーニング法を開発しました。この方法では、キャピラリ・フロー・テクノロジーを使用したバックフラッシュにより、目的化合物溶出後の面倒なカラム焼き出しが必要なく、GC分析にかかる時間が70分から14.5分へと大幅に短縮できます。また、10から200 µg/gの範囲で高い直線性が維持され、決定係数は0.9996を超えました。目的化合物の回収率は両化合物とも95%以上でした。

Agilent Technologies

はじめに

メラミンおよびシアヌル酸による食品の汚染が世界中で注目を集めています。乳製品の分析における大きな問題の1つは、タンパク質や脂質といった、低揮発性または不揮発性のマトリクス成分の存在です。また、サンプル前処理をきちんと行わずにこのような成分を含むサンプルを分析した場合、分析システム自体が汚染される可能性もあります。マトリクス除去の一般的な方法は高温でのカラム焼き出しですが、これにはサンプル分析よりも長い時間がかかります。たとえば、FDAが定める乳抽出のアプリケーション[1]には通常70分かかります。目的化合物の揮発度および極性が広範囲であるため、選択的な抽出やサンプル導入も容易ではありません。また、ルーチンで行うQC分析については、サイクルタイムを25分から60分短縮して生産性を向上させたいと考えています。Agilent 7890A/5975C GC/MSDシステムはバックフラッシュとオーブンの急速冷却により必要な時間短縮を実現します。

このアプリケーションノートでは、U.S. FDAの方法に、標準的なスプリット/スプリットレス注入口とAgilentのキャピラリ・フロー・テクノロジーを取り入れて改良したアプリケーション開発について説明します。メークアップガスを接続した3ウェイスプリッタをカラムの出口につなぎ、リストリクタでMSDと接続し、カラムの出口圧を補助的なエレクトロニックニューマティクコントロール(EPC)で制御します。カラムから最後の目的ピークが溶出した後でカラム注入口の圧を下げカラム出口の圧を上げることで、カラム内にキャリアガスの逆流を起こし、マトリクス妨害物、特に高沸点成分を、カラムの注入口側から排除します。[2]

実験

標準と試薬

表1にこの実験で使用した標準と試薬を示します。メラミンとシアヌル酸の濃度1,000 µg/mLの原液は、それぞれメタノールで調製しました。標準の原液は冷蔵庫で保管します。

表1. 標準と試薬

標準	メラミン	Sigma-Aldrich	純度>99%
	シアヌル酸	Sigma-Aldrich	純度>99%
溶媒	メタノール	Fisher Scientific	HPLCグレード
	ピリジン	Fisher Scientific	公認A.C.S.試薬
シリル化試薬	BSTFA with 1% TMCS*	Supelco	/

* BSTFA:bis(トリメチルシリル)トリフルオロアセトアミド、TMCS:トリメチルクロロシラン

装置

実験はスプリット/スプリットレスキャピラリ注入口を装備したAgilent 7890Aガスクロマトグラフ/5975C トリプルアクシスディテクタ GC/MSD、およびAgilent 7683Bオートサンプラ(ALS)を用いて行いました。スプリット/スプリットレス注入口には長寿命セプタム(部品番号5183-4761)およびスプリット注入ライナー(部品番号5188-4647)が取り付けられています。
注入は10 µLシリンジ(部品番号9301-0714)で行いました。装置類の条件を表2に示します。

表2. ガスクロマトグラフおよび質量分析計の条件

GC条件	
カラム:	HP-5ms、30 m×0.25 mm×0.25×m (部品番号19091S-433)
注入口温度	EPCスプリット/スプリットレス@ 250 °C
注入量	1 µL、スプリット比は3:1
キャリアガス	ヘリウム、コンスタントフローモード、1.3 mL/min
オーブンプログラム	75 °C (1分)、30 °C/分で300 °Cまで(1分)
分析後	280 °C、5分間維持(バックフラッシュ時間)
トランスファーライン	280 °C
MS条件	
MS	EI、SIM/スキャン
溶媒ディレイ	4.2分
MS温度	230 °C (ソース)、150 °C (四重極)
スキャンモード	マスレンジ(40 to 450 amu)
SIMモード	イオン(メラミン:342、327*、171、99 シアヌル酸:345*、330、188)
バックフラッシュ条件	
装置	3ウェイスプリッタ(部品番号G3183B)
リストリクタ	0.706 m×180×m id
アウトレット	PCM (部品番号G1530-63309)
出口圧	2 psi (分析後は60 psi)
注入口圧力	2 psi (分析後)

*定量イオン

サンプル前処理

抽出

0.5 gのサンプル(粉末または液体)を20 mLポリプロピレン遠心分離チューブで計量し、5 mLのメタノールを添加しました。サンプルのキャップを閉め、ボルテックスで攪拌後、超音波で10分間処理しました。その後4,000 rpmで6分間遠心分離し、上澄み液を0.45 µm PTFEフィルタでろ過してガラス製GCバイアルに移しました。

誘導体化

抽出液の上澄み40 µLをガラス製GCバイアルに移します。抽出物を窒素気流下で約70 °Cにて乾固し、50 µLのピリジンおよび50 µLのBSTFAを加えます。サンプルはボルテックスで攪拌し、70 °Cで30分間インキュベートします。

結果と検討

乳抽出物に対するバックフラッシュを用いた 7890A/5975C GC/MSD

乳抽出物には通常、低揮発性または不揮発性の成分が多数含まれています。これらの成分は、カラムの前方付近にとどまり、オーブン温度が充分上がるまでカラムの外に出ない可能性があります。このアプリケーションでは、3ウェイスプリッタでメークアップガスを使ってバックフラッシュを行いました。装置にはメークアップガス供給ラインと4つのコネクタが付いており、コネクタの1つは分析カラム用、3つは3台の検出器に接続したリストリクタチューブ用です。本アプリケーションで使用する検出器はMSDのみなので、1つ目と2つ目のコネクタはメークアップガスの流れの方向でキャップされ、3つ目はカラムに、そして4つ目はリストリクタを経由してMSDに接続されました。この接続方法は、ガスの流れの乱れによるピーク拡張をさけるためのものです。リストリクタチューブの長さと内径は、それぞれ0.706 mと0.18 mmです。GC/MSシステム設定および3ウェイスプリッタ用供給ライン接続の方法を図1に示します。

まず、乳抽出物をバックフラッシュなしの通常モードで分析しました。溶出に時間がかかる物質も確実に溶出できるよう、オーブンは300 °Cにプログラムしました。抽出物からすべての成分を溶出するのに70分を超える時間がかかりました（図2A）。次に抽出物を5分間のバックフラッシュ付きで分析しました（図2B）。バックフラッシュは、出口の圧を上げ、注入口の圧を下げることで実行しました。カラム内で逆流がおき、「重い」成分がカラム注入口経由でスプリットベントから排出されました。図2Cにバックラッシュ後に行った、溶媒を用いた70分間のブランク分析を示します。このブランク分析より、バイアルセプタム由来のピークがいくつかあるのを除けば、バックフラッシュ後のカラムがきれいになっていることがわかります。300 °Cで55分間カラムを焼き出す代わりにバックフラッシュを使用したことで、重いマトリクス成分がカラムから効果的に除去できています。これにより、分析時間が70分から14.5分に短縮でき、スピードが4.8倍向上しました。

マトリクスが複雑な場合、長時間焼き出しを行っても高沸点成分を除去することができず、次の注入でピークリテンションタイムがずれる可能性があります。図3は、抽出物を5分間のバックフラッシュを用いて2回連続で行った分析を示します。高いリテンションタイムとピーク面積の再現性が得られ、キャリーオーバーの兆候もゴーストピークもなく、ベースラインの上昇も見られないことがわかります。

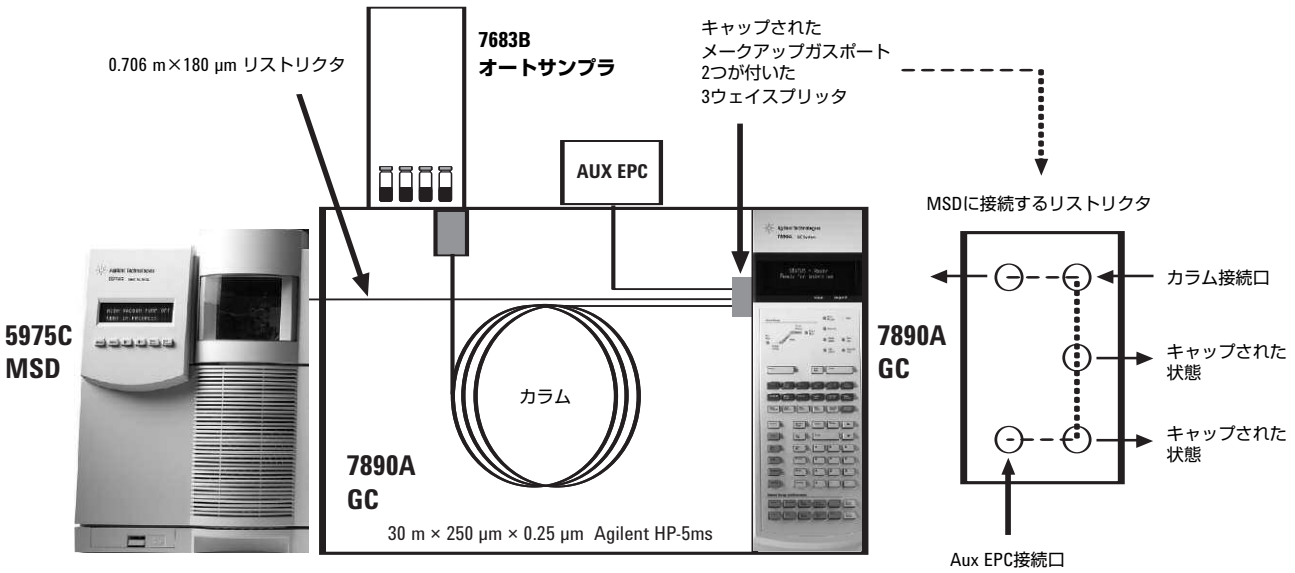

図1. GC/MSシステム設定および3ウェイスプリッタ用供給ライン接続の方法

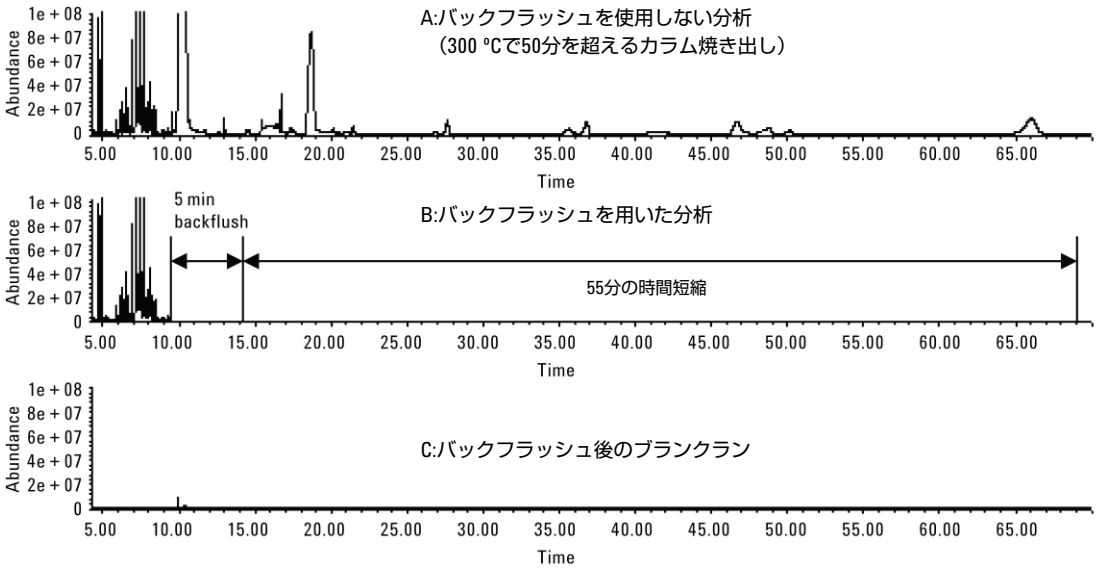

図2.　バックフラッシュによる時間短縮

以上より、バックフラッシュは高温での焼き出しと異なる分析間でのリテンションタイムのずれを避けるための、非常に優れた方法であることがわかります。また、Agilent 7890Aのオーブンの急速冷却機能によってもサイクルタイムが短縮されています。このアプリケーションでは3ウェイスプリッタを使ってMSDをベントせずにライナーとカラムを切り替えることで、さらなる時間短縮を実現することができます。

図4は目的化合物を添加した粉末乳サンプルのトータルイオンクロマトグラム（TIC）です。目的イオンはSIM/スキャン同時取り込みにより高感度SIMモードでモニターされ、ライブラリ検索可能なスキャンデータが一回の分析で同時に取得できます。これは、結果がポジティブかネガティブか確認するプロセスをさらに単純化できます。図5はそれぞれシアヌル酸tri-TMS誘導体（6.335分）およびメラミンtri-TMS誘導体（7.341分）の質量スペクトルを表します。

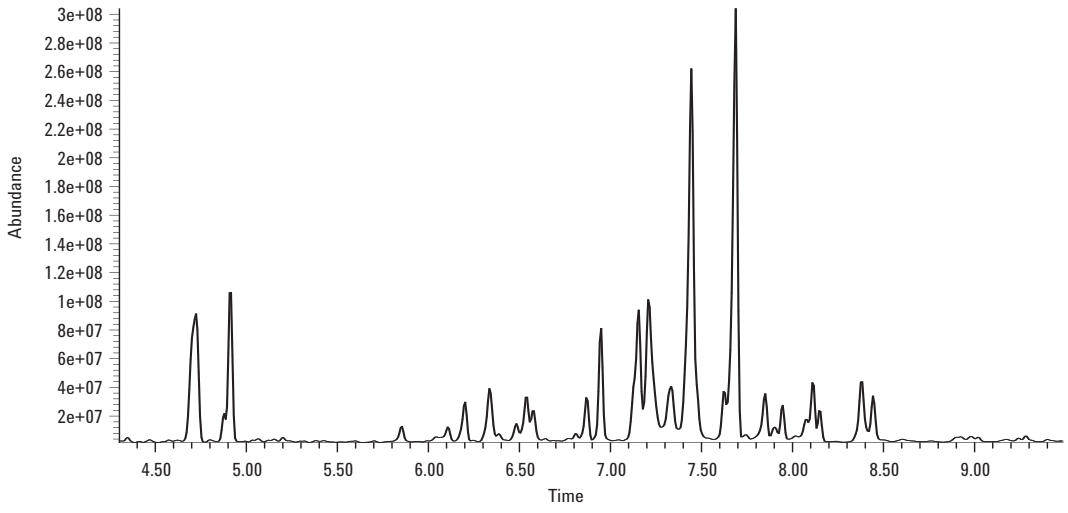

図3.　乳児用調製粉乳の抽出物を2回連続で分析したトータルイオンクロマトグラムの重ね描き

直線性と回収率

直線性実験には対象化合物を含まない乳サンプルを使用しました。0.5 gの乳サンプルに4レベルのシアヌル酸およびメラミン（10、20、80、および200 µg/g）を添加しました。10から200 µg/gの範囲にて、両成分に関して高い直線性が得られ、決定係数は0.9996以上でした。

この方法の適用性を確認するために、40 µg/gの対象化合物を添加した乳児用調製粉乳（対象化合物含まず）の分析を行いました。その結果、シアヌル酸で96.1%、メラミンで95.6%という高い回収率が得られました（表3参照）。

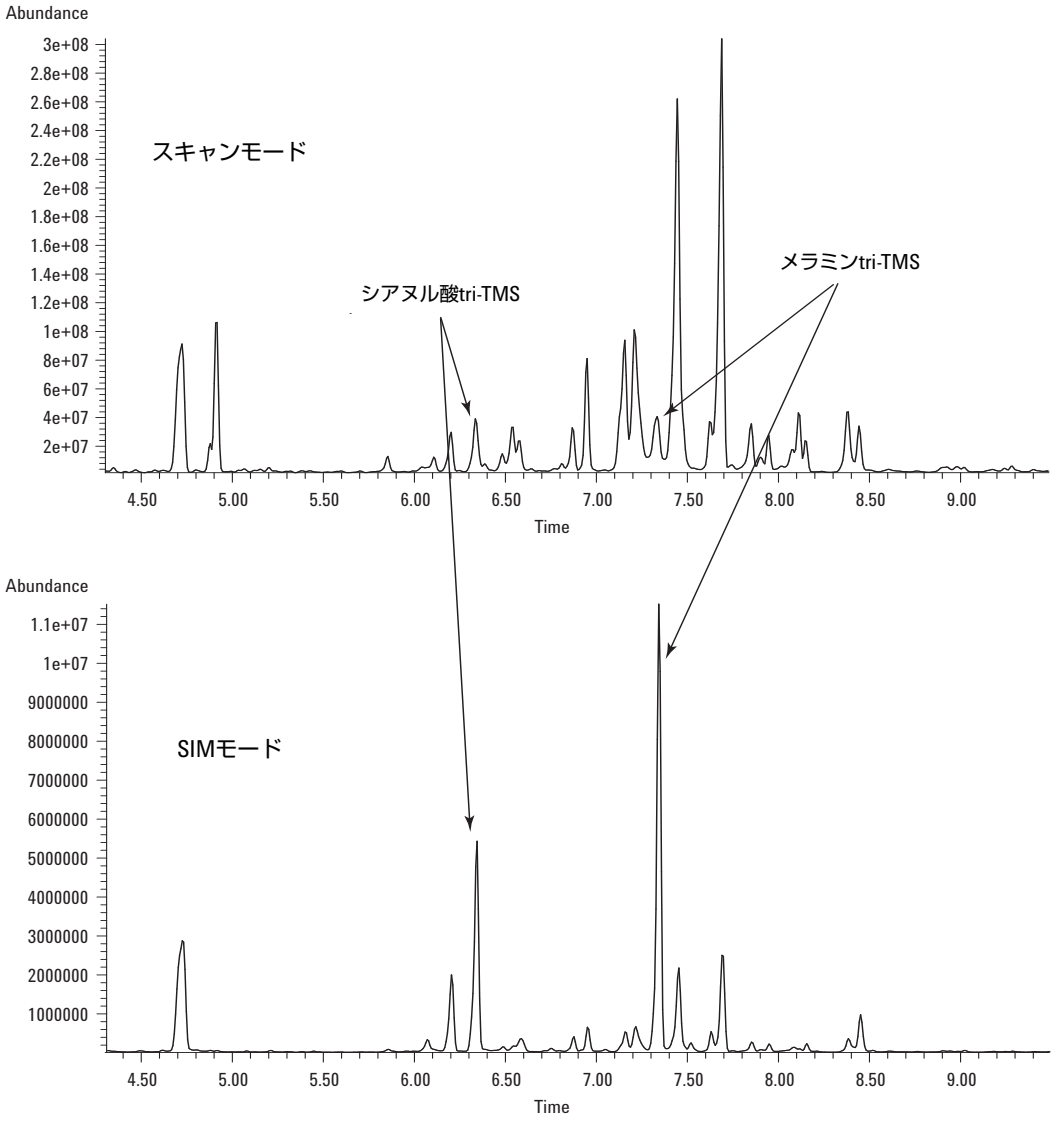

図4.　乳児用調製粉乳サンプルのTIC

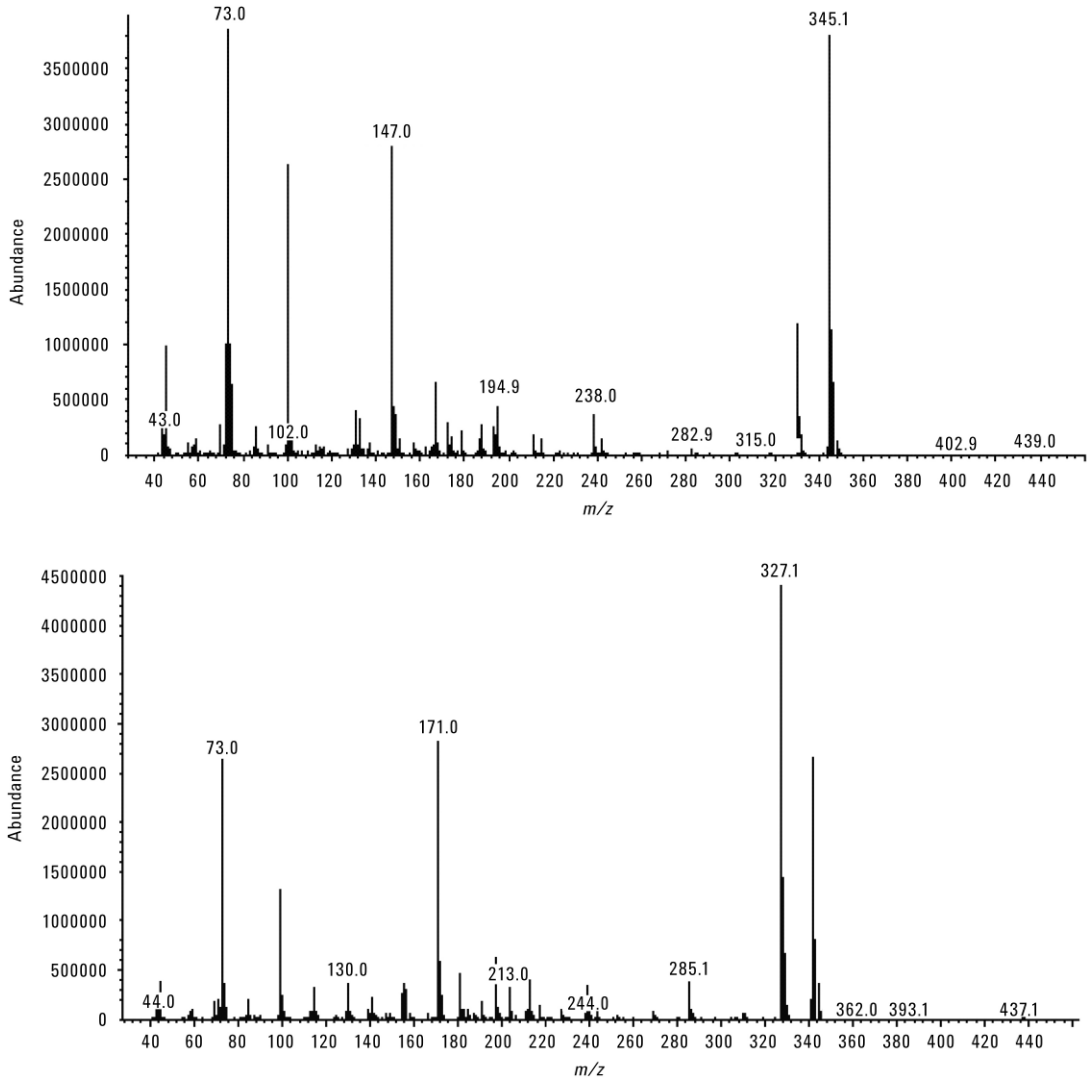

図5. シアヌル酸tri-TMS誘導体（上）およびメラミンtri-TMS誘導体（下）の質量スペクトル

表3. 添加されたサンプルの回収率

化合物	RT（分）	添加レベル（µg/g）	測定レベル（µg/g）	回収率（%）
シアヌル酸 tri-TMS	6.319	40	38.42	96.1
メラミン tri-TMS	7.333	40	38.23	95.6

実サンプル分析

ある銘柄の液状乳を、上で解説した方法にて、バックフラッシュ付きで分析しました。対象化合物は2つとも10分未満で同定され、シアヌル酸が34.90 µg/g、メラミンが3.72 µg/gでした（図6参照）。

結論

ここで説明した、乳製品中のメラミンおよびシアヌル酸分析のための高速スクリーニング法および定量法では、高い直線性と回収率が実現できました。バックフラッシュと組み合わせたAgilent 7890A/5975C GC/MSDにより、既存の方法を使った場合と比べて分析時間が5分の1に短縮できました。この結果から、この高速スクリーニングはメラミンおよびシアヌル酸の検出による乳製品の品質管理に適した方法ということができます。

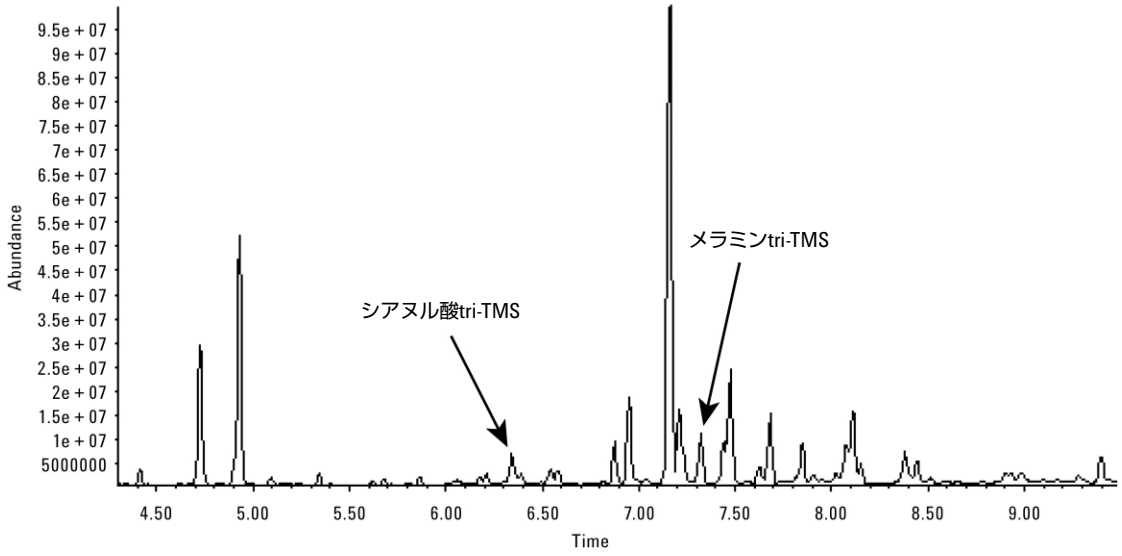

図6. 液体状態の汚染された乳サンプルに関するトータルイオンクロマトグラム

参考文献

1. U.S. Food and Drug Administration, “GC-MS Method for Screening and Confirmation of Melamine and Related Analogs,” Version 2, May 7, 2007.
2. Mike Szelewski, "New Tools for Rapid Pesticide Analysis in High-Matrix Samples," Agilent Technologies publication 5989-1716EN, Oct.13, 2004.

詳細情報

アジレント製品とサービスの詳細については、アジレントのウェブサイトwww.agilent.com/chem/jpをご覧ください。

www.agilent.com/chem/jp

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。

本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。著作権法で許されている場合を除き、書面による事前の許可なく、本文書を複製、翻案、翻訳することは禁じられています。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc., 2008
Published in Japan
October 8, 2008
5989-9866JAJP

Agilent Technologies